

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 12 日現在

機関番号：13101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25670882

研究課題名(和文)ペリオドンタルメディスン病因論の新展開-口腔細菌による腸内細菌叢攪乱説の樹立-

研究課題名(英文)New hypothesis for the pathogenesis of periodontal medicine

研究代表者

山崎 和久(YAMAZAKI, Kazuhisa)

新潟大学・医歯学系・教授

研究者番号：00182478

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：マウス口腔から代表的な歯周病原細菌である*P. gingivalis*を投与すると、脂肪組織、肝臓、および腸管組織に炎症性的変化が生じ、インスリン抵抗性が誘導されることが明らかになった。*P. gingivalis*投与により腸内細菌叢が変化するとともに、腸管のバリア機能が低下し、血液中の細菌内毒素量が増加することが明らかになったことから、歯周病原細菌による腸内細菌叢の攪乱がその原因と考えられた。今回の結果は歯周病と全身疾患の関連の因果関係を説明するのに合理的な生物学的分子基盤を提供する。

研究成果の概要(英文)：We revealed that oral administration of *P. gingivalis* induced the inflammatory changes in the adipose tissue, liver, and gut. These changes were associated with insulin resistance. Furthermore, oral administration of *P. gingivalis* induced an alteration of the gut microbiota, a decreased gut barrier function, and an elevation of blood endotoxin levels in a mouse model. Our study showing that swallowing large amounts of oral bacteria alters the gut microbiota provides a rationale for the biological basis of a causal association between periodontal disease and systemic diseases.

研究分野：歯周病学

キーワード：歯周病 全身疾患 腸内細菌叢

1. 研究開始当初の背景

歯周疾患は冠動脈疾患、糖尿病など、メタボリックシンドロームと関連した疾患のリスクを高めるといわれている。その病因として全身的に軽微な炎症が重視されている。実際、我々も歯周炎患者において炎症マーカーの上昇を報告している(J Periodont Res. 2005; Clin Exp Immunol. 2007; J Periodont Res.2010)。しかし全身的な炎症メディエーターの上昇が歯周組織局所で産生されたそれらを反映したものかどうかは明らかにされていない。実際、我々の実験的マウス *P. gingivalis* 口腔感染モデルでは、血清中のCRP、IL-6は上昇するが、歯周組織局所の炎症はきわめて軽微である(PLoS ONE. 2011)。

近年、肥満やメタボリックシンドロームと腸内細菌との間に関連性があることを示す研究が相次いで発表された(Nicholson et al., Science. 2012; 336: 1262)。肥満の全身に及ぼす影響は白色脂肪組織における軽度の炎症状態とその結果誘導される全身的なインスリン抵抗性に起因すると考えられる。

脂肪組織における炎症惹起には腸管から取り込まれた腸内のグラム陰性細菌由来リポ多糖が関係していることが報告されており(J Clin Invest. 2006)、この状態を称して代謝性内毒素血症(Metabolic endotoxemia)と命名されている。

歯周炎患者の唾液 1ml 中には 10^7 - 10^8 の細菌が含まれると言われる(J Dent Res. 1995)。胃あるいは十二指腸から口腔細菌が検出されることから、少なくとも一部は胃液による分解・変性を免れて下部消化管にまで到達していることが明らかにされている(PLoS ONE. 2008)。もし飲み込まれた大量の細菌により腸内細菌叢が健康なヒトのそれとは異なったものに変化し、その結果 metabolic endotoxemia が誘導されて炎症メディエーターによる影響が全身に及ぶと考えると、これまで報告されている歯周炎と関連する疾患の因果関係のほとんどは説明できることになる。

2. 研究の目的

マウス口腔感染モデルをベースに、新たに脂肪組織を主なターゲットとしてメタボリックシンドローム関連分子ならびに小胞体ストレス関連分子の解析を行うと同時に、口腔感染の腸内細菌叢に及ぼす影響をメタゲノム解析の手法により明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 実験的マウス口腔感染モデルの作成

これまで *P. gingivalis* を定着させる目的であらかじめ抗生物質で口腔内細菌叢を破壊していたが、抗生物質は腸内細菌叢のバランスも破壊すること、また *P. gingivalis* は口腔内の共生細菌を増殖させることで“歯周”病原性を発揮している(Hajishengallis et al., Cell Host & Microbe 2011)ことから、

SPF マウスにそのまま *P. gingivalis* を接種することとする。

6週齢の C57BL/6 マウスに *P. gingivalis* の生菌 10^8 CFU をカルボキシメチルセルロースとともに1週間に2回口腔より投与する。

(2) 体重・血糖値測定

感染終了後マウスの体重を測定した後、24時間絶食させる。腹腔内に体重あたり 1 g/kg の濃度のグルコースを投与し、実験動物用血糖測定システムにて血糖値の変化を経時的に測定する。またインスリン抵抗性試験のため、絶食させたマウスに 0.5 IU/kg の濃度のインスリンを腹腔内投与し、同様に血糖値の変化を経時的に測定する。

(3) 組織解析

精巢上体脂肪組織肝臓および顎骨を取り出し、全 RNA を抽出する。cDNA を合成し、DNA マイクロアレイを用いてそれぞれの組織における遺伝子発現を網羅的に解析する。さらに脂肪組織においてはインスリン抵抗性、炎症に関連する遺伝子、肝臓においては脂質代謝関連遺伝子、歯周組織においては小胞体ストレス関連遺伝子にターゲットを絞り、定量的 PCR 法でより詳細に解析する。脂肪組織については凍結切片を作成し、好中球、マクロファージマーカーによる免疫染色を行う。

(4) 血中アディポサイトカインの測定

ELISA 法を用いてアディポネクチン、CTRP9、TNF- α 、IL-6、MCP-1 の定量を行う。

(5) 腸内細菌叢の解析

腸内細菌の大部分は嫌気性菌であることから、好気性菌の増殖を抑えるため感染終了時に開腹し、回腸より糞便をできるだけ迅速に取り出し、RNA later™を含む保存液に入れる。検体より DNA を抽出し、16S rDNA に対する PCR を行ったのち、PCR 産物を次世代シーケンサー (Roche/454 GS-Junior または Illumina MiSeq) でハイスループットに配列決定する。得られた配列データをもとに、既知微生物 16S rRNA 配列データベースに対して相同性解析を行い各読み取り配列の由来生物種を同定する。その結果を生物種ごとに集計することにより、門 (phylum)、綱 (class)、目 (order)、科 (family)、属 (genus)、種 (species) ごとの比較集計情報を得る。腸内細菌叢のメタゲノム解析は大阪大学微生物病研究所遺伝情報実験センター感染症メタゲノム研究分野で行う。

4. 研究成果

P. gingivalis 投与により、耐糖能異常とインスリン抵抗性が誘導されることが明らかになった。この変化は脂肪組織におけるインスリン抵抗性関連遺伝子発現の上昇、インスリン感受性関連遺伝子の発現低下が関連していることが示された。TNF- α 、IL-1、IL-6

などの炎症性サイトカイン遺伝子発現は有意に上昇していた。脂肪組織における炎症はインスリン抵抗性を誘導することが知られている。特に TNF- α はタンパクレベルでの産生上昇も明らかになった。TNF- α はインスリン受容体下流の IRS-1 のチロシンリン酸化を阻害してグルコーストランスポーターの細胞膜への移動・発現を阻害することが知られている。一方、インスリン感受性に関連する Peroxisome proliferator activator receptor- α 及び、CTRP9、IRS-1 遺伝子の発現が有意に低下していた。

肝臓においては脂肪組織と同様、TNF- α 、IL-6 遺伝子発現の上昇が認められた。さらに、脂肪蓄積に關する遺伝子発現の上昇と平衡して脂肪滴の蓄積が認められた。また、PPAR- α 、IRS-1 遺伝子発現の低下も認められた。歯周組織においては、*P. gingivalis* 口腔感染により歯肉組織における小胞体ストレス関連遺伝子が上昇していた。一方で 4-PBA 投与により同遺伝子発現が抑制されるとともに歯槽骨吸収が抑制されたが、炎症性サイトカイン発現において大きな差は認められなかった。さらに同群では破骨細胞関連遺伝子発現が有意に減少したことより、小胞体ストレスは破骨細胞形成に直接的に關与している可能性が示唆された。また invitro で 4-PBA の添加が RANKL 誘導性の破骨細胞形成を抑制した。

P. gingivalis 口腔投与に伴って腸内細菌叢はバクテロイデス門の比率が増加し、フィルミキ्यूテス門の比率が低下した。Operational Taxonomy Unit (OUT) 解析によりバクテロシデス目に属する細菌群の比率が上昇していることが明らかになった。*P. gingivalis* は分類学上この群に含まれるが、*P. gingivalis* 特異的プライマーによる解析では、回腸内容物中に *P. gingivalis* は検出できなかった。*P. gingivalis* の消化管内での消長を明らかにするために 1 回投与後に空腸、回腸、大腸内容物について解析したところ、投与後 16 時間では大腸内からもほとんど検出できなかった。これらの結果は投与した *P. gingivalis* はと腸管内に定着・増殖することなく、腸内細菌叢を変動させることが明らかになった。

P. gingivalis 投与による腸内細菌叢の変化は腸管バリア機能に重要な役割を演じているタイト結合タンパクの遺伝子発現を低下させるとともに、IL-6、IL-12b、IFN- γ 、IL-17c などの炎症性サイトカイン遺伝子の発現を上昇とも関連していた。さらに、小腸型アルカリフォスファターゼ遺伝子の発現も抑制した。小腸型アルカリフォスファターゼ遺伝子を欠損させたマウスでは血中内毒素レベルの上昇を来し、ヒト非アルコール性脂肪肝疾患と類似した表現型を示すことが知られている。これら遺伝子発現の変化と同時に、興味深いことに血中のエンドトキシンレベルを上昇させることも明らかになっ

た。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計2件)

Arimatsu K, Yamada H, Miyazawa H, Minagawa T, Nakajima M, Ryder MI, Gotoh K, Motooka D, Nakamura S, Iida T, Yamazaki K. Oral pathobiont induces systemic inflammation and metabolic changes associated with alteration of gut microbiota. Sci Rep. 査読有. 4: 4828, 2014.

(ア)DOI:10.1038/srep04828.

Yamada H, Nakajima T, Domon H, Honda T, Yamazaki K. ER stress response and bone loss in experimental periodontitis in mice. J Periodont Res. 査読有. 2014 in press.

(ア)DOI: 10.1111/jre.12232.

[学会発表](計12件)

Arimatsu K, Nakajima M, Matsuda Y, Takahashi N, Yamada H, Minagawa T, Nakajima T, Tabeta K and Yamazaki K. Effect of Bacterial and Inflammatory Stimulation on CTRP9 Expression. 93rd General session of the IADR, March 14, 2015, Boston (USA).

山崎和久: 口腔細菌による腸内細菌叢の変化と代謝に及ぼす影響. シンポジウム I 臨床医歯学における微生物学の新展開. 第 48 回日本無菌生物ノートバオロジー学会総会. 2015 年 1 月 30 日, グランドプリンスホテル広島(広島県・広島市).

Yamada H, Nakajima T, Domon H, Honda T, Yamazaki K. ER stress response and bone loss in experimental periodontitis mouse model. 62nd Annual meeting of JADR, December 4, 2014, KKR Hotel, (Osaka).

Yamazaki K. Change of gut microbiota by oral bacteria: A novel mechanism linking periodontal infection and systemic diseases. Symposium on Effect of Periodontitis on Systemic Disease in Useful Model Systems. 92nd General session of the IADR, June 28, 2014, Cape Town (South Africa).

Arimatsu K, Domon H, Yamada H, Nakajima M, Miyazawa H, Miyauchi S, Nakajima T, Tabeta K and Yamazaki K. *P. gingivalis* induces systemic

diseases via dysbiosis of gut microbiota. 92nd General session of the IADR, June 27, 2014, Cape Town (South Africa).

中島麻由佳、有松 圭、高橋直紀、皆川高嘉、山田ひとみ、松田由実、佐藤圭祐、多部田康一、中島貴子、山崎和久 . *Porphyromonas gingivalis* 経口単回投与によるマウス腸内細菌叢の変動 . 第 141 回日本歯科保存学会 2014 年度秋季学術大会、2014 年 10 月 31 日、山形テルサ (山形県・山形市) .

有松 圭、山田ひとみ、宮内小百合、宮沢春菜、中島麻由佳、多部田康一、中島貴子、山崎和久 . *Porphyromonas gingivalis* 経口投与はマウス腸内細菌叢を変動させインスリン抵抗性を誘導する . 平成 26 年度新潟歯学会第 1 回例会、2014 年 7 月 12 日、新潟大学歯学部 (新潟県・新潟市) .

有松 圭、山田ひとみ、宮内小百合、宮沢春菜、中島麻由佳、多部田康一、中島貴子、山崎和久 . *Porphyromonas gingivalis* 口腔投与によるマウス腸内細菌叢の変動と内毒素血症の関連 . 第 57 回春季日本歯周病学会学術大会、2014 年 5 月 23 日、長良川国際会議場 (岐阜県・岐阜市) .

山田ひとみ、土門久哲、宮内小百合、宮沢春菜、多部田康一、中島貴子、山崎和久 . *Porphyromonas gingivalis* 口腔感染マウスモデルにおいて小胞体ストレスと歯槽骨吸収の関連 . 第 57 回春季日本歯周病学会学術大会、2014 年 5 月 23 日、長良川国際会議場 (岐阜県・岐阜市) .

山崎和久 : 歯周病と心血管病変リスクの関連 . ワークショップ「口腔内炎症性疾患と全身の関連」第 102 回日本病理学会総会、2013 年 6 月 7 日、ロイトン札幌 (北海道・札幌市) .

有松 圭、土門久哲、山田ひとみ、宮内小百合、宮沢春菜、皆川高嘉、中島麻由佳、中島貴子、多部田康一、山崎和久 . *Porphyromonas gingivalis* 口腔感染マウスモデルで誘導されるインスリン抵抗性は脂肪組織および肝臓における炎症反応と関連する . 第 56 回春季日本歯周病学会学術大会、2013 年 6 月 1 日、タワーホール船堀 (東京) .

山崎和久、有松 圭、土門久哲、山田ひとみ、宮内小百合、宮沢春菜、皆川高嘉、中島麻由佳、中島貴子、多部田康一 . *Porphyromonas gingivalis* 口腔感染は

マウス腸内細菌叢を変動させインスリン抵抗性を誘導する . 第 56 回春季日本歯周病学会学術大会、2013 年 6 月 1 日、タワーホール船堀 (東京) .

〔その他〕

新聞報道

平成 26 年 5 月 10 日新潟日報朝刊

平成 26 年 6 月 18 日読売新聞朝刊

Dental Tribune 2014 年 5 月 7 日

ホームページ等

http://www.dent.niigata-u.ac.jp/yamazaki_lab/

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

山崎 和久 (YAMAZAKI Kazuhisa)

新潟大学・医歯学系・教授

研究者番号 : 0 0 1 8 2 4 7 8

(2) 研究分担者

本田 朋之 (HONDA Tomoyuki)

新潟大学・医歯学総合病院・医員

研究者番号 : 3 0 4 4 7 6 3 5

(3) 連携研究者

中村 昇太 (NAKAMURA Shota)

大阪大学・微生物病研究所・助教

研究者番号 : 9 0 4 3 2 4 3 4